

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710276

研究課題名(和文) ラマータグの開発と応用

研究課題名(英文) Raman tag imaging for visualization of small molecules in live cells

研究代表者

山越 博幸 (Yamakoshi, Hiroyuki)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30596599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：小さなアルキン標識を用いた低分子化合物のイメージング法として、「アルキントグラマンイメージング」の開発を行った。EdUを内標準として、アルキン化合物の詳細な構造-ラマンシフト/強度相関を調べた。得られた知見を利用して、二種類のアルキン標識化合物(EdUとCoQ誘導体AltQ)の同時イメージング、および生細胞中にあるAltQsの半定量解析を行った。さらに、FCCPのプロトン化状態を識別して生細胞イメージングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Alkyne-tag Raman imaging was proposed as an approach for live cell imaging of small molecules by using an alkyne-tag. Structure-Raman shift/intensity relationships of various alkynes was examined by use of EdU as standard. On the basis of obtained results, simultaneous imaging of two alkyne-tagged molecules, EdU and alkyne-tagged CoQ analogue (AltQ), and semiquantitative estimation of cellular concentration of CoQ analogues have been achieved. Finally, simultaneous imaging of protonated and deprotonated carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) was successfully demonstrated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：ラマン アルキン タグ 生細胞イメージング 顕微鏡 EdU FCCP CoQ

### 1. 研究開始当初の背景

生きた細胞の中にある分子を観察するためには目印が必要であり、一般的に蛍光標識(分子量>200)が用いられている。しかし、蛍光標識は低分子化合物(分子量<1000)の標識としては大きすぎるため、蛍光標識の導入に伴う化合物の活性低下がしばしば問題となる(図1)。そのため、蛍光標識の影響を受けずに低分子化合物を観察できる方法の開発が切に求められている。

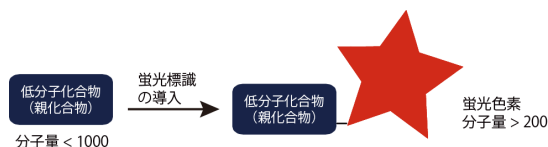


Figure 1. 蛍光標識の導入

蛍光標識を用いずに低分子化合物を観察する方法として、ラマン顕微鏡法が挙げられる。蛍光顕微鏡法が光を当てて放出される蛍光を検出するのに対し、ラマン顕微鏡法はラマン散乱光(分子振動に応じた光の波長変化)を検出する。したがって、ラマン顕微鏡法は理論上無標識で全ての分子を観察できる。しかしながら、ラマン散乱断面積は $10^{-30}$  cm<sup>2</sup>程度であり、一般的な蛍光色素の光吸収効率( $10^{-16}$  cm<sup>2</sup>程度)と比べて極めて小さく、ラマン散乱が微弱な分子には適さない。また、細胞のように複雑な混合物中において、特定の分子のシグナルを区別するのは極めて困難である。そのため、生細胞ラマンイメージングの観察対象化合物は限られているのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究ではラマン標識(タグ)を用いて低分子化合物の生細胞局在解析を行うことを目的とした。細胞内に存在する分子がラマン散乱をほとんど発しないサイレント領域(1800–2800 cm<sup>-1</sup>)に、強く特徴的なラマン散乱を示す極めて小さなラマンタグの開発を目指す。無標識イメージングが利点とされてきたラマン顕微鏡法に、あえて小さなラマン標識を用いることで、広範な低分子化合物の局在解析が実現可能になり、蛍光標識導入に伴う諸問題を根本的に解決するものと期待した。

### 3. 研究の方法

(1) 簡便な相対ラマン散乱強度評価法を確立し、ラマン標識として利用可能な官能基のスクリーニングを行う。  
 (2) ラマン標識を持つ化合物の構造ラマンシフト/強度相関を調べることにより、様々な化合物に適用するための知見を得る。また、得られた相関を生細胞系で評価する。  
 (3) 構造ラマンシフト/強度相関を利用して、複数の化合物の同時イメージングを行う。さらに、ラマン標識のラマンシフトの変化を利用して、細胞内に存在する化合物の構造情報

を取得する。

### 4. 研究成果

(1) サイレント領域に強いラマン散乱を示す小さな官能基の中で、細胞内安定性が高いと考えられる「アルキン」、「アジド」、「ニトリル」、「重水素」のラマン散乱強度について、ヘキサ酸を母骨格として比較した(表1)。なお、ラマン散乱は一般に標準物質を用いて相対強度が報告されているが、生物活性化合物の解析に適した手法が存在しなかったため、独自の相対強度評価法を確立した。既に生細胞ラマンイメージングに成功している市販のアルキン修飾化合物 EdU(5-エチニル 2'-デオキシウリジン)を内標準とし、EdU に対する相対ラマン散乱強度を RIE 値として算出し、相対強度を比較した。結果、アルキンが最も強いラマン散乱を与えた。また、ニトリルはアルキンの 40%程度の散乱強度であったが、アジドの散乱は微弱なものであった。なお、ピークの形状が複雑であったため、重ヘキサ酸の RIE 値は未決定だが、別途重アセトニトリルのラマンスペクトルを測定し、重水素を一つ導入した場合の RIE 値を 0.02 程度と見積もった。以上より、ピーク強度と形状を考慮すると、アルキンが最も優れたラマン標識だが、観察対象に応じてニトリルや重水素も利用可能な標識であると考えられた。

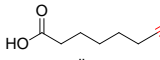
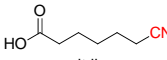
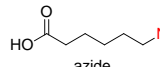
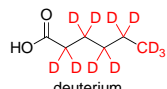
		
	alkyne	nitrile
relative intensity vs EdU (RIE)	0.15	0.062
Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	2110	2242
		
	azide	deuterium
relative intensity vs EdU (RIE)	0.022	—
Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	2096	2124

Table 1. ラマン標識のスクリーニング

(2) アルキンを含む化合物 89 種の相対ラマン散乱強度を評価した。置換基の違いにより 14 グループに分類し、まとめた結果を図2に示した。化合物によってラマン散乱強度に 100 倍以上の差が観察された。不飽和結合と共役しているアルキンが強いラマン散乱を示し、アルキル基が置換した場合と芳香環が置換した場合には散乱強度に 6 倍程度の差が確認された。また、二つのアルキンが直結するブタジンの散乱強度は同じタイプの置換基を持つアルキンのおよそ 6 倍であった。4 炭素から成る比較的小さな構造かつ強いラマン散乱を与えるブタジンは有望なラマン標識と考えられる。古くから報告されている通り、アルキンのラマンシフトは 2091~2255 cm<sup>-1</sup> の波数領域に観察された。ラマンシフトが異なるアルキンを含んだ化合物数種類を混合した溶液のラマンスペクト

ルを測定した。各々のピークは分離可能であり、複数のラマン標識化合物を同時観察できることを示した。

R: アルキル, アルケニル, アシル etc. Ar: 芳香環, X: Si, Me, Br, or I

Group	average RIE	Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	Group	average RIE	Raman shift (cm <sup>-1</sup> )
A1	0.16	2084 - 2113	D1	0.65	2222 - 2225
A2	0.11	2221 - 2241	D2	1.4	2247 - 2255
A3	0.40	2164 - 2195	D3	1.7	2217 - 2222
B1	0.81	2091 - 2107	E1	4.8	2208
B2	1.0	2198 - 2248	E2	4.1	2237 - 2249
B3	2.1	2157 - 2194	E3	7.8	2207
C	6.2	2216 - 2219	F	25	2217 - 2221

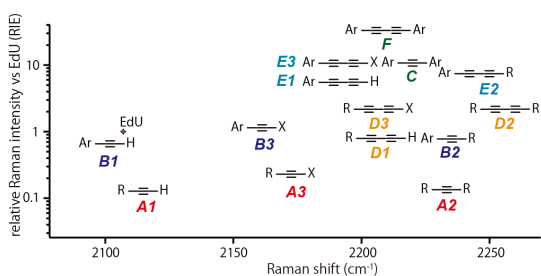


Figure 2. アルキンを含む化合物のラマンシフト/強度相関

続いて、ニトリルを含む化合物 28 種の相対ラマン散乱強度を評価した。アルキンの場合と同様に、ニトリルの伸縮振動方向に共役系が広がるほど大きなラマン散乱を与えた (図 3)。また、表 1 の結果から予想される通り、ニトリルのラマン散乱強度は同じ置換基を持つアルキンの数分の一程度であった。

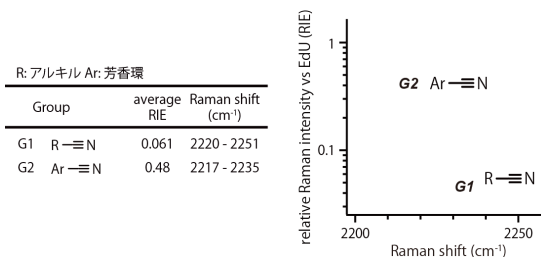


Figure 3. ニトリルを含む化合物のラマンシフト/強度相関

以上のように DMSO 中で得られた相対ラマン散乱強度が実際の生細胞観察の指標となるか検証するため、様々なアルキン標識を持つユビキノン (CoQ) 誘導体 AltQ1~8 を合成した (図 4)。なお、同程度に細胞に取り込まれることを期待して、各誘導体は同程度の CLogP 値を持つように設計した。HeLa 細胞を 20 μM の AltQs で 1 時間処理した後、平均ラマンスペクトルを取得した。結果、DMSO 中の相対強度と AltQs を処理した細胞から得られたアルキンのラマン散乱強度は概ね相関した (図 5)。特に、RIE 値が 0.5 よりも大きい化合物についてはアルキンピークの検出が容易であった。一方、RIE 値が 0.5 よりも小さな化合物の解析は困難であったが、条件次第で検出可能であった。

次に、ブタジイン型 (Group D2) のラマン

標識を持ち、側鎖長の異なるユビキノン誘導体 AltQ9~16 を合成し、側鎖長と細胞内への取り込み量の関係を調べた (図 6)。20 μM の AltQs を処理した HeLa 細胞の平均ラマンスペクトルを取得した。DMSO 溶液で測定したラマンスペクトルから作成した検量線を使用して細胞中の化合物濃度を算出したところ、最も側鎖が短い AltQ9 の細胞内濃度は処理濃度のおよそ 100 倍の 2 mM と見積もられた (図 7)。また、側鎖が長いほど顕著に取り込み量の低下が観察された。わずか一炭素の違いによる取り込み量の差が検出できたことは、ブタジイン標識の有用性を実証するものであり、十分に小さな標識を用いて低分子化合物を観察することの重要性を改めて浮き彫りにした。

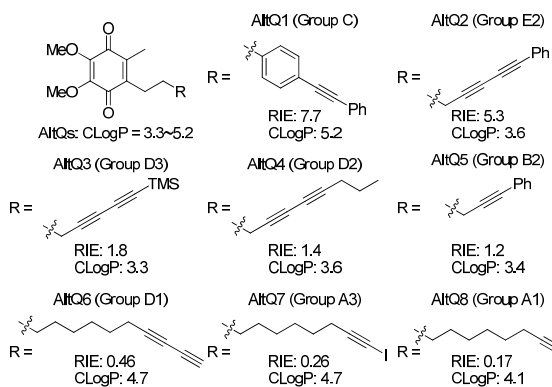


Figure 4. アルキン標識を持つユビキノン誘導体

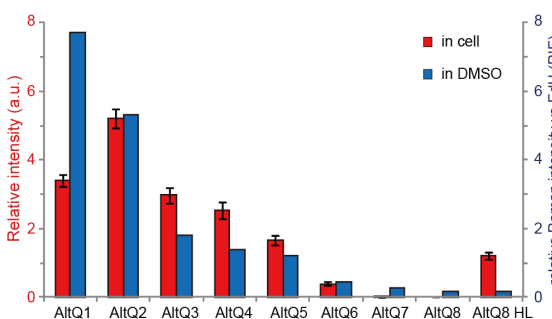


Figure 5. AltQs の相対ラマン散乱強度

compound	RIE	CLogP	R
AltQ9	1.6	3.1	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ4	1.4	3.6	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ10	1.3	4.1	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ11	1.2	4.7	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ12	1.3	5.2	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ13	1.4	5.7	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ14	1.6	6.2	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ15	1.4	6.8	<chem>CCCCC#CC</chem>
AltQ16	1.4	7.3	<chem>CCCCC#CC</chem>

Figure 6. ブタジイン標識を持つユビキノン誘導体

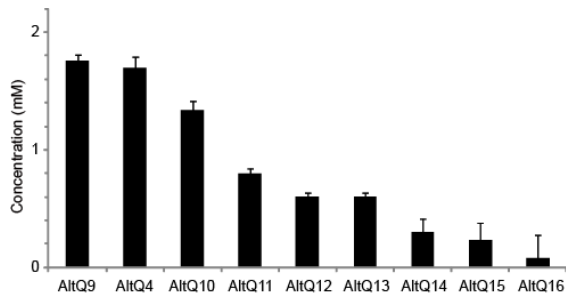


Figure 7. ジェイン標識を持つユビキノン誘導体の細胞内濃度

(3) 構造ラマンシフト/強度相関の結果を利用して、複数の分子の同時観察を行った(図8)。40  $\mu\text{M}$  の EdU と 2  $\mu\text{M}$  の AltQ2 を処理した HeLa 細胞のラマンイメージを取得した。EdU のアルキンのラマン散乱と帰属される 2122  $\text{cm}^{-1}$  の強度分布が核に観察されたのに対して、AltQ2 のジェインのラマン散乱と帰属される 2248  $\text{cm}^{-1}$  の分布は主に細胞質であった。また、図にはシトクローム c の分布(747  $\text{cm}^{-1}$ )のみを代表として示したが、内在性分子のラマン散乱の分布も無標識で得られており、同時に様々なコントラストのイメージを取得した。

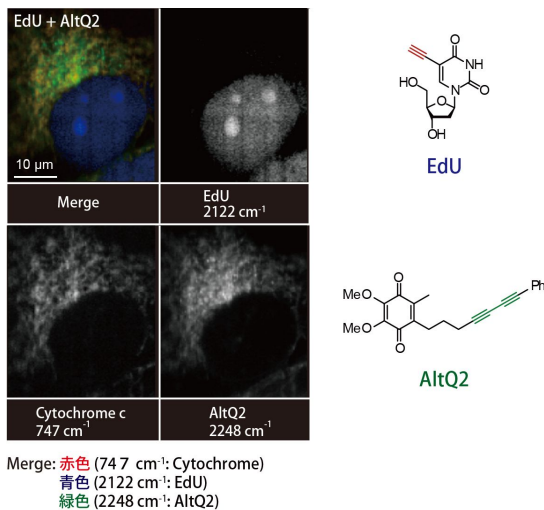


Figure 8. EdU と AltQ2 を処理した HeLa 細胞のラマンイメージ

広い共役系を持つラマン標識を利用することで生細胞中にある分子の構造情報が取得できると考え、生化学研究にしばしば用いられている酸化リン酸の脱共役剤 FCCP(カルボニルシアニド パラトリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン)をモデル化合物とした検討を行った(図9)。本化合物の pKa はおよそ 6.0 と報告されており、生理的な pH の緩衝液(pH 7.4)存在下でラマンスペクトルを測定した場合、FCCP は脱プロトン化されたイオン型の状態になっており、ニトリルのラマン散乱が 2175 および 2195  $\text{cm}^{-1}$  に観察された。一方、酸性の緩衝液(pH 4.6)存

在下では、FCCP はプロトン化された分子型の状態であり、ニトリルのラマン散乱は 2226  $\text{cm}^{-1}$  に観察された。

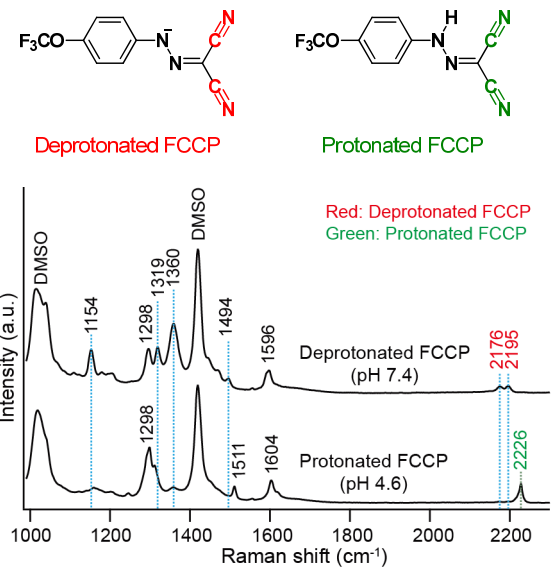


Figure 9. FCCP の構造とラマンスペクトル

次に、100  $\mu\text{M}$  の FCCP を処理した HeLa 細胞のラマンイメージを取得した(図10)。得られたシトクローム c の分布(753  $\text{cm}^{-1}$ )は粒状であり、報告されている脱共役剤投与時のミトコンドリアの形状と類似していた。脱プロトン化された FCCP のラマン散乱と帰属される 2176  $\text{cm}^{-1}$ 、および 2197  $\text{cm}^{-1}$  の強度分布は比較的細胞質全体に広がっていた。一方、プロトン化された FCCP のラマン散乱と帰属される 3330  $\text{cm}^{-1}$  の強度分布は粒状であり、脂質の分布(2851  $\text{cm}^{-1}$ )に近いものであった。本結果は、疎水性の脂質中では分子型の状態が有利になるためと考えられる。実際、非プロトン性の有機溶媒中で FCCP のラマンスペクトルを測定した場合、プロトン化された FCCP のスペクトルが得られた。

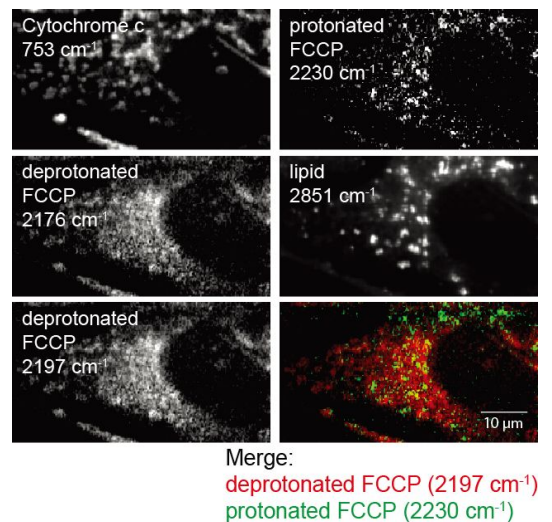


Figure 10. FCCP を処理した HeLa 細胞のラマンイメージ

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Yamakoshi, H.; Palonpon, A. F.; Dodo, K.; Ando, J.; Kawata, S.; Fujita, K.; Sodeoka, M. “Simultaneous imaging of protonated and deprotonated carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone in live cells by Raman microscopy” *Chem. Commun.* **2014**, 50, 1341–1343. 査読有

Palonpon, A. F.; Ando, J.; Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Sodeoka, M.; Kawata, S.; Fujita, K. “Raman/SERS microscopy for molecular imaging of live cells” *Nat. Protoc.* **2013**, 8, 677–692. 査読有

Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Palonpon, A.; Ando, J.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. “Alkyne-tag Raman imaging for visualization of mobile small molecules in live cells” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20681–20689. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

山越博幸 “ラマンタグを用いた低分子化合物の生細胞イメージング” 理研シンポジウム：最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-[4], 2014年5月1日, 片平さくらホール(宮城県)

山越博幸、闔闔孝介、安藤潤、Palonpon Almar、藤田克昌、河田聡、袖岡幹子 “アルキン修飾化合物の生細胞ラマンイメージング” 日本薬学会第133年会、2013年3月30日、パシフィコ横浜(神奈川県)

山越博幸、闔闔孝介、Palonpon Almar、安藤潤、岡田昌也、藤田克昌、河田聡、袖岡幹子 “ラマンタグを用いた低分子化合物の生細胞イメージング” 理研シンポジウム：最先端光計測とライフサイエンスの近未来-バイオ・ラマン 2017-[4], 2012年10月27日、理化学研究所(埼玉県)

④ 山越博幸、闔闔孝介、岡田昌也、安藤潤、Palonpon Almar、藤田克昌、河田聡、袖岡幹子 “アルキン修飾化合物の Click-free ラマンイメージング” 日本薬学会第132年会、2012年3月31日、北海道大学(北海道)

⑤ Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Almar Palonpon, Masaya Okada, Jun Ando, Fujita Katsumasa, Kawata Satoshi, Mikiko Sodeoka “Click-free imaging of alkyne-tagged molecule by Raman microscopy” 11<sup>th</sup> iCeMS International Symposium, Shiran Kaikan (Kyoto)

山越博幸、闔闔孝介、Palonpon Almar、岡田昌也、安藤潤、藤田克昌、河田聡、袖岡幹子 “ラマン顕微鏡を用いたDNA合成プローブ EdU の生細胞イメージング” 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会、2011年5月24日、東京工業大学(東京都)

〔図書〕(計1件)

山越博幸、闔闔孝介、安藤潤、藤田克昌、袖岡幹子 “アルキン標識を用いた低分子化合物のラマンイメージング” 実験医学増刊、**2012**, 30, 1220–1226.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山越 博幸 (YAMAKOSHI HIROYUKI)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：30596599

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし